

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-073497

(43)Date of publication of application : 19.03.1996

(51)Int.Cl.

C07K 14/18
 C07K 7/08
 C07K 19/00
 C12N 1/21
 C12N 15/09
 C12P 21/02
 G01N 33/53
 G01N 33/569
 G01N 33/576
 //(C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12P 21/02
 C12R 1:19)

(21)Application number : 06-232073

(71)Applicant : TONEN CORP

(22)Date of filing : 31.08.1994

(72)Inventor : YAGI SHINTARO
 KASHIWAGUMA TOMIKO
 KOBAYASHI TOMOKO
 CHIBA YUKIE
 HASEGAWA AKIRA

(54) EPITOPE CHIMERA ANTIGENIC PEPTIDE FOR DISCRIMINATING INFECTION OR GROUP OF HEPATITIS C VIRUS, ITS PRODUCTION AND METHOD FOR DISCRIMINATING INFECTION OR GROUP USING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new peptide useful for discriminating the grouping and infection, etc., of hepatitis C virus(HCV) by joining different sites on a group I HCV-related antigen coded with the hepatitis C genome RNA or its cDNA.

CONSTITUTION: This new epitope chimera antigenic peptide is obtained by joining two or more different epitopes in the epitopes comprising peptides having amino acid sequences represented by formulas I to IV, etc., on antigens related to a group I HCV coded with an HCV genome RNA or its cDNA through a peptidic joint having no or low antigenicity. The peptide is useful for discriminating the grouping of the HCV or infection of group I HCV with a good accuracy. The chimera antigenic peptide is obtained by preparing a DNA fragment capable of coding the chimera antigenic peptide, integrating the resultant DNA fragment into a vector, constructing a replicable expression vector and then expressing the resultant expression vector in a host cell.

Ala Val Ile Phe Ser Arg Cys Ala Ser Cys Glu Asp Lys Phe Val
 1 10 15

Glu Asp Ala Ser His Leu Phe Cys Ile Glu Lys Cys Ser Glu Lys Val
 1 10 15
 Glu Glu Phe Lys Glu Arg Ser Lys Glu Lys Lys
 20 25

Glu Glu Phe Lys Cys Arg Glu Lys Glu Lys Glu Thr Glu Thr Lys
 1 10 15
 Glu Ala Glu Ala Ala Ala
 20 25

Phe Arg Glu Thr Ile Phe Cys His Arg Arg Phe Glu Glu Arg Thr Lys
 1 10 15
 Ala Glu Thr Lys
 20 25

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.08.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3665371

[Date of registration] 08.04.2005

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-73497

(43)公開日 平成8年(1996)3月19日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/18		8318-4H		
	7/08	8318-4H		
	19/00	8318-4H		
C 1 2 N 1/21		8828-4B		
		9281-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求 請求項の数12	F D (全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-232073

(22)出願日 平成6年(1994)8月31日

(71)出願人 390022998

東燃株式会社

東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

(72)発明者 八木 慎太郎

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

(72)発明者 柏熊 富子

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

(72)発明者 小林 倫子

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 久保田 耕平 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルス感染又はグループ判定のためのエпитープキメラ抗原ペプチド、その製法、及びそれを使用する感染又はグループ判定法

(57)【要約】

【構成】 C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムRNA又はそのcDNAによってコードされるグループI又はII HCV関連抗原上の異なる2つ以上のエпитープをペプチド性つなぎ目を介して接合して成る、それぞれグループI又はII HCV感染を特異的に判別するためのエпитープキメラ抗原ペプチド、その製法、及びそれを用いるHCVグループ判定又はHCV判定方法。

【効果】 従来グループ判別が困難であった血清等の検体であっても、本発明のエпитープキメラ抗原によってその判別が可能となり、HCVのグルーピング判別、HCV感染判定に精度良く使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 C型肝炎ウイルス（HCV）ゲノムRNA又はそのcDNAによってコードされるグループI HCV関連抗原上の異なる2つ以上のエピトープをペプチド性つなぎ目を介して接合して成る、グループI HCV感染を特異的に判別するためのエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項2】 前記ペプチド性つなぎ目が抗原性をもたないか又は低抗原性であることを特徴とする請求項1記載のエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項3】 前記エピトープが、HCVのNS4領域又はコア領域上に存在することを特徴とする請求項1又は2に記載のエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項4】 前記エピトープが、配列番号3、4、5及び9に示されるアミノ酸配列をもつペプチドから選択されることを特徴とする請求項3記載のエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項5】 配列番号1又は2によって示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1記載のエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項6】 C型肝炎ウイルス（HCV）ゲノムRNA又はそのcDNAによってコードされるグループII HCV関連抗原上の異なる2つ以上のエピトープをペプチド性つなぎ目を介して接合して成る、グループII HCV感染を判別するためのエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項7】 前記ペプチド性つなぎ目が抗原性をもたないか又は低抗原性であることを特徴とする請求項6記載のエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項8】 前記エピトープがHCVのNS4領域又はコア領域上に存在することを特徴とする請求項6又は7に記載のエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項9】 前記エピトープが、配列番号6、7、8及び10に示されるアミノ酸配列をもつペプチドから選択される、ことを特徴とする請求項8記載のエピトープキメラ抗原ペプチド。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか一項に記載のエピトープキメラ抗原ペプチドの製造方法であって、該エピトープキメラ抗原ペプチドをコードするDNA断片を作製する段階、該DNA断片をベクターに組み込んで複製可能な発現ベクターを構築する段階、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換する段階、得られた形質転換体を培養し、発現したペプチドを回収する段階を含むことを特徴とする前記方法。

【請求項11】 請求項1～5のいずれか一項に記載のエピトープキメラ抗原ペプチド又は請求項6～9のいずれか一項に記載のエピトープキメラ抗原ペプチドと、C型肝炎ウイルス（HCV）に感染したと推定される試料中のグループI又はグループII特異的な抗体との免疫学的反応を行なった後、生成する抗原-抗体複合体の濃度

又は存在を測定することを含む、HCVグループ判定方法。

【請求項12】 請求項1～9のいずれか一項に記載のエピトープキメラ抗原ペプチドと、C型肝炎ウイルス（HCV）に感染したと推定される試料中のHCV関連抗体との免疫学的反応を行なった後、生成する抗原-抗体複合体の濃度又は存在を測定することを含む、HCV感染判定方法。

【発明の詳細な説明】

10 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、C型肝炎ウイルス感染判定又はグループ判定に使用するためのエピトープキメラ抗原ペプチド、その製法、及びそれを使用する感染又はグループ判定法に係る。

【0002】

【従来の技術】非A非B型肝炎は伝染性の肝炎でありウイルスを媒体として伝播すると考えられている。非A非B型肝炎の伝播経路はいまだ明らかになっていない部分が多いが、輸血、血液製剤により引き起こされる非A非B型肝炎は、B型肝炎のスクリーニング体制が確立された今日、輸血後肝炎として医療上の大きな問題点となっている。

【0003】1989年非A非B型肝炎に関連したウイルス遺伝子の一部がクローニングされ、C型肝炎ウイルス（HCV）と命名された。ほぼ同時期に本出願人を含む多くの研究グループによりHCV遺伝子が数多く単離され、その構造上の特徴が明らかとなった（Science 244: 359-362(1989)及びScience 244: 362-344(1989)）。

【0004】推定されるHCV遺伝子は約9400塩基からなる+鎖のRNAをゲノムとして持ち、約3000アミノ酸からなる一つながりのポリペプチドをコードしていると考えられている。予想されるアミノ酸配列はフラビウイルスあるいはペスチウイルスと相同性を持ち、これらのウイルスに近縁のウイルスであろうと考えられている。これらのウイルス構造との比較から、HCVゲノムによってコードされるポリペプチドは、1本のポリペプチドとして細胞内において合成された後に、アミノ末端から構造蛋白質であるコア、エンベロープ（E1）、NS1またはE2（NS1/E2）と、非構造蛋白質であるNS2、NS3、NS4、NS5に切断され、それぞれの機能を果たすと考えられている。

【0005】これらの非構造蛋白質のうちNS3、NS4のアミノ酸配列を比較することによりHCVは少なくとも2種類のグループ（グループI、グループII）に分類可能であることが明らかとなった[Tsukiyama-Kohara et al. Virus Genes (1991)5: 243-254]。ひとはカイロン社により分離されたHCVと核酸、アミノ酸レベルでの相同性の高いグループIと、核酸、アミノ酸レベルでの相同性の低いグループIIとに分類される（本出願人による特開平5-84085号公報）。

【0006】グループI HCVとグループII HCVとの違いについては未だ明らかになっていない部分が多いが、金井 [Kanai et al., Lancet (1992) 339: 1543] や吉岡 [Yoshioka et al., Hepatology (1992) 16: 293-299] 等はグループII感染患者の方がグループI感染患者よりもインターフェロン治療が効果的であることを報告している。このことはグループ判別を効率良く行なうことにより、インターフェロン治療がより効果的に行なえるようになることを示唆している。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は、詳細な検討により、NS4領域のグループIとII間のアミノ酸配列が最も異なる領域(1676から1760まで)の配列を持つペプチドは、グループI由来の配列を持つものはグループI HCVに感染した患者血清中の抗体と反応し、グループII由来の配列を持つものはグループII HCVに感染した患者血清中の抗体と反応すること、さらにこれらの配列を持つペプチドを組み合わせ、患者血清との反応性を調べることにより、患者が何れのグループに属するHCVに感染しているのかを判別することが可能となることを明らかにしてきた(特願平5-194185号)。

【0008】しかしながら、多くの血清を検索するなかで、グループ判別が困難な患者血清が、低い比率ではあるが存在することが今回初めて明らかになった。

【0009】したがって、本発明は、これらの判別困難であった血清でもグループ判別可能になるエпитープキメラ抗原ペプチド及びその製造方法を提供することを目的とする。

【0010】本発明はまた、このようなエпитープキメラ抗原ペプチドをHCV感染又はグループ判定に使用することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)ゲノムRNA又はそのcDNAによってコードされるグループI HCV関連抗原上の異なる2つ以上のエпитープをペプチド性つなぎ目を介して接合して成る、グループI HCV感染を特異的に判別するためのエпитープキメラ抗原ペプチドを提供する。

【0012】本発明はまた、HCVゲノムRNA又はそのcDNAによってコードされるグループII HCV関連抗原上の異なる2つ以上のエпитープをペプチド性つ

なぎ目を介して接合して成る、グループII HCV感染を特異的に判別するためのエпитープキメラ抗原ペプチドを提供する。

【0013】グループI HCV及びグループII HCVには、遺伝子構造が互いに異なる領域が存在することが、本発明者らの研究によって判明してきている(特願平5-194185号)。例えば、NS4領域中アミノ酸番号1676~1764のアミノ酸配列は、HCVのグループIとグループIIとで大きく相違し、両者の識別を可能にする。このようにHCVグループIとIIの識別を可能にする領域は、NS4領域以外にも存在し、例えばコア領域にも存在することが今回判明した。HCVグループI及びグループIIについては、前述のとおり、カイロン社により分離されたHCV株(C5-1-1: 国際公開番号WO89/04669号)との核酸、アミノ酸レベルでの相同性の比較によって決定され、相同性のより高い(通常80%以上)HCV株をグループI、相同性のより低い(通常80%未満)HCV株をグループIIと称している。グループII HCV株の中にはカイロン社のグループI HCV株との相同性が約50%と極めて低いものも存在する。したがって、HCVゲノムDNAのヌクレオチド配列上には、NS4領域及びコア領域以外にもHCVグループIとグループIIを識別可能にする他の領域も存在するものと推定される。

【0014】本発明のHCV関連抗原上のエпитープには、NS4及びコア領域上のエпитープの他に、これら領域以外のHCVグループI及びIIを区別する他の領域のエピトープも包含される。本発明においては、そのようなエピトープがHCVのNS4領域又はコア領域上に存在することが好ましい。エピトープの具体例は、下記の説明から明らかであろう。

【0015】コア領域のペプチドを用いたグループ判別 上述したように、HCVにはグループIとIIの異なる種類が存在しており、グループIとIIはアミノ酸配列に部分的な相違を有している。両者の配列をHCV遺伝子全体にわたって比較することにより、NS4以外にもグループ特異的に配列が異なる領域がコア領域のアミノ酸番号61から80にあたる領域に存在することが今回判明した。この領域についてグループIとIIを比較した結果を下記に示す。

【0016】

【表1】

5		70	80	6
グループ I	RRQPIPKARR	PEGRTWAQPC		
	RRQPIPKARR	PEGRTWAQPC		
	RRQPIPKARR	PEGRTWAQPC		
HCV J6	RRQPIPKARR	stGksWgkPG	グループ II	
HCV J8	RRQPIPKARR	stGksWgkPG	グループ II	

(註) HCV J6 : J. Gen. Virol. 72 : 2697-2704 (1991)

HCV J8 : Virology 188 : 331-341 (1992)

上記の領域に於てグループ内でアミノ酸配列は保存されているのに対し、グループ間でアミノ酸配列が異なっている。この領域の配列が抗原性を持ち、グループ判別の抗原として用いることが可能か否かを明らかにするため、それぞれのアミノ酸配列を持つペプチドを作製し、患者血清との反応性を調べた（下記実施例1参照）。

【0017】その結果、血清との反応性はNS4領域を用いた場合の反応性と比較すると反応する血清数が少ないことから、グループ判別のための主要なエпитープを提供しているとは考えられないが、HCVグループ特異的に反応していることは、PCR法及びNS4領域を用いた判別結果との比較により明らかとなった。さらに詳細に検討すると、NS4領域には反応せず、この領域にのみグループ特異的に反応する患者血清が、グループIの血清に於て少数ながら存在することが明らかになった。

【0018】コア領域上のグループI又はグループII HCV特異的抗原のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号9又は10に示す。

【0019】上記の結果、コア領域の配列を持つペプチドを用いた判別方法は、NS4領域を用いたものと比較すると、その検出率に於て大きく劣るものの、少数の患者血清に於て検出可能となることから、NS4領域を用いた判別方法を相補することが期待出来ることを示唆している。

【0020】NS4領域ペプチドのエピトープ解析

NS4領域のうちグループI HCVに於ては、グループI HCVのポリプロテイン1676から1760に相当するアミノ酸配列を持つC14-1-2抗原、グループII HCVに於ては、グループII HCVのポリプロテイン1680から1764に相当するアミノ酸配列を持つC14-2-2抗原を、抗原として用いることによりグループ判別が可能である

（本出願人による特願平5-194185号）。

【0021】患者血清中に存在する抗体は、これらのグループ特異的抗原へ単独に、もしくは両者に結合する。グループIに対応するC14-1-2抗原に単独に結合した場合には、患者はグループI HCVに感染しており、グループIIに対応するC14-2-2抗原に単独に結合した場合には、患者はグループII HCVに感染していることが明白に判定可能である。

【0022】一方両者に反応する抗体が検出された場合でも、その反応性が異なっていることから、判別可能である。すなわちグループIに感染している場合にはC14-1-2抗原と強く反応し、これは希釈した血清が各抗原と反応して生じる、ELISA反応の基質反応産物の与える吸光度を比較することにより判定することができる。しかしながらこのような血清に於ては、血清中に存在するHCVに対する抗体が、グループI及びII抗原両者に、反応の強さは異なるものの非特異的に反応する場合もあり、このような反応を出来るだけ抑えることが望ましい。

【0023】上記反応を生じせしめる領域を見いだすために、C14-1-2抗原、C14-2-2抗原と抗体との反応特異性を調べた。実施例2に具体的な方法を記載したが、C14-1-2抗原と患者血清中の抗体との反応は、ペプチド1-W、1-X、1-Yを反応に加えることにより阻害され、さらに1-Wで阻害が認められたものについては、1-Wの配列を分断化した配列を持つ1-Waを加えると反応の阻害が認められた。

【0024】一方C14-2-2抗原と患者血清中の抗体との反応は、ペプチド2-W、2-X、2-Yを反応に加えることにより阻害され、さらに2-Wで阻害が認められたものについては、2-Wの配列を分断化した配列を持つ2-Waを加えると反応の阻害が認められた。

【0025】これらの結果からC14-1-2 抗原上の患者血清の認識配列(エпитープ)は1-Wa(配列番号3)、1-X(配列番号4)、1-Y(配列番号5)にあり、C14-2-2 抗原上の患者血清の認識配列(エпитープ)は2-Wa(配列番号6)、2-X(配列番号7)、2-Y(配列番号8)にあることが判明した。

【0026】エピトープキメラ抗原の設計

グループI HCV感染判別抗原としては、C14-1-2 抗原が適しており、患者血清中の抗体は1-Wa、1-X、1-Yペプチドをエピトープとして認識し結合している。一方患者血清のうち少数はC14-1-2 に対する抗体を持っていないが、コア領域に対する抗体を持っている。グループ判別抗原としてはこれらの抗体の何れとも反応するものが望ましい。しかしながら、コア領域とNS4領域はHCV遺伝子上で大きく離れていることから、HCV遺伝子からこれらの配列のみを一つながりのものとして取り出すことは困難である。

【0027】そこで本発明者等は、HCVのグループ判別を可能にする領域上に存在する互いに異なる2つ以上のエピトープを組み合わせた人工的に構築したエピトープキメラ抗原、例えばC14-1-2 抗原のグルーピング抗原として最適な性質と、それを相補するコア抗原の性質とを兼ね備えたキメラ抗原を構築することにより、HCVグループ判別だけでなくHCV感染判定の確度を高め得ることを見出した。

【0028】本発明によって可能となったエピトープキメラ抗原は、明らかになったエピトープをただ単純に結合させることによって作製できるものではない。すなわち、単純にエピトープ配列を組み合わせた場合には、エピトープの接合によって生じる配列が、新たなエピトープとなり、非特異反応を生じさせる可能性が生じる。またペプチドが短鎖の場合には立体構造が取れないために、正常な立体構造が形成された場合にはエピトープとして機能する配列が、エピトープとして機能しないことがある。そのため、ペプチドの鎖長を長くすることにより、短鎖ペプチドでは見いだせなかったこのような配列がエピトープとして機能し、目的とする機能以外の働きをする可能性がある。

【0029】本発明は、このような問題点を解決する方法を示すものである。

【0030】エピトープキメラ抗原は以下の手順に従うことにより効率的に設計することができる。始めにエピトープペプチドの性質を調べることが重要である。即ちエピトープはそれに結合する抗体の結合部位(パラトープ)と水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、疎水結合等により非共有的に結合する。結合が成立するためにはエピトープ上のこれらの力が作用する部位と、パラトープ上の作用する部位とが一定の空間配置を取ることが必要である。すなわちエピトープとして機能する配列からなるペプチドが、エピトープとして機能するた

めには、パラトープに結合できる立体構造を取ることが必要である。一方ペプチドの高次構造は、ペプチドの長さが変わるペプチドにアミノ酸が付加されることにより変化することが予想されることから、エピトープキメラ抗原において、エピトープペプチドを単に付加した場合には抗原性を失う可能性が生じる。そのためエピトープキメラ抗原を設計する際にはこのような構造変化を生じさせない工夫をする必要がある。そのため組み合わせるエピトープペプチドの本来の構造を知る必要がある。

【0031】エピトープペプチドの構造を知るためには、結晶構造のエックス線回折、核磁気共鳴(NMR)分析により構造が分析できているものであれば、それを用いればよいが、一般にはこのような例は少ないことから、アミノ酸配列からその2次構造予測を行なう方法、例えばChouとFasman等によって開発された計算式[Chou P.Y. & Fasman G. D. (1974) Biochemistry 13: 211-222; Chou P.Y. & Fasman G.D. (1974) Biochemistry 13: 222-245; Chou P.Y. & Fasman G. D. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276]やRobson等によって開発された計算式[Robson B. & Suzuki E. (1976) J. Mol. Biol. 107: 327-356; Garnier, J., Osguthorpe D. J. & Robson B. (1978) J. Mol. Biol. 120: 97-120]などを利用し解析を行なう。さらにHoppとWoods [Hopp T. P. & Woods K.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828]やKyteとDoolittle [Kyte J. & Doolittle R. F. (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132]等によって開発された計算式に従い、蛋白質の疎水-親水プロットを行ないエピトープペプチドが示す性質に関する情報を得ておくことが好ましい。さらにJamesonとWolf [Jameson B.A. & Wolf H. (1988) Comput. Applic. in Bioscience 4: 181-186]によって提唱されている計算式に従い、目的とするペプチドの抗原性に関する予測した性質も知っておくことは好ましいことである。さらにJanin等やEmini等によって提唱されている表面部位の予測法[Janin J., Wodak S., Levitt M. & Maigret B. (1978) J. Mol. Biol. 125: 357-386; Emini E., Hughes J.V., Perlow D.S., & Boger J. (1965) J. Biol. 55: 836-839]、Karplus等によって提唱されている蛋白質の可塑性予測法[Karplus P.A. & Schulz G.E. (1985) Naturwiss. 72: 212-213]で得られる情報も抗原性を予想する際に役立つ。

【0032】ここで上記の各種解析を行なう際に重要なことは、エピトープ解析を行なった条件でのエピトープペプチドの情報を得ておくことである。例えば実施例に示したものでは、C14 抗原という約100 アミノ酸からなる配列と抗体とを反応させる際に、短鎖ペプチドを加えることによる結合阻害によりエピトープ解析を行なったが、この場合にはエピトープは長い配列の中で機能しているものであるから、上記の解析はこの長い配列を元に

【0033】エpitopeキメラ抗原に於ては、これらの予測法によって得られるエpitopeペプチドの予測構造が変化しないように、キメラ抗原ペプチドを設計する必要がある。

【0034】さらにエpitopeキメラ抗原に於ては、エpitopeペプチドのつなぎ目が新たなエpitopeを提供しないように設計されねばならない。この予測は以下の方法によって成し得る。

【0035】一つはつなぎ目によって生じるペプチド配列を用いて遺伝子情報、蛋白構造情報バンクを検索し、一致する配列が無いことを確認する。もしくは一致する配列があったとしても抗原性が無いことが確認できれば良い。

【0036】本発明においては、つなぎ目のペプチド配列が抗原性をもたないか又は抗原性が低いと予測される配列を持つようにアミノ酸を付加、もしくは欠失させることにより設計する。付加すべきアミノ酸としては、例えばイソロイシン、ロイシン、バリン等の疎水的な性質を持つアミノ酸が好ましく、疎水性アミノ酸を付加することによってペプチド性つなぎ目の疎水性が増しエpitopeとして機能する可能性を低くすることができる。すなわちエpitopeキメラペプチドにおいてエpitopeとして機能させるには、分子表面にエpitopeが露出していることが肝要であり、疎水的な性質を付加することにより、分子表面に露出させる可能性を低くすることができる。

【0037】すなわち、本発明のエpitopeキメラ抗原ペプチドにおいては、ペプチド性つなぎ目は抗原性をもたないか又は低抗原性であることを特徴とする。

【0038】上記の方法に従い最適な感染HCVグループ判別抗原として配列番号1に示す配列からなるペプチドGR1EPV5、配列番号2に示す配列からなるペプチドGR1EPV4を設計した。

【0039】エpitopeキメラ抗原の作製

本発明のエpitopeキメラ抗原は、化学合成法により、又は遺伝子工学的手法を用いて作製することができる。

【0040】化学合成法の場合、該方法は、HCVゲノムRNA又はそのcDNAによってコードされるグループI又はグループII HCV関連抗原上の異なる2つ以上のエpitopeの各々を従来のペプチド合成法を用いて合成する段階、ペプチド性つなぎ目を別個に合成する段階、エpitopeとエpitopeの間をペプチド性つなぎ目を介して結合する段階を包含する。ペプチド合成法は周知の技術であり、例えば日本生化学会編、生化学実験講座1「タンパク質の化学IV-化学修飾とペプチド合成」

(1981年)東京化学同人に記載される種々の手法が使用され得る。長鎖ペプチドの場合には、通常、固相法が用いられる。またアミノ酸の保護及び脱保護の技術もペプチド合成において一般的に使用される。

【0041】遺伝子工学的手法の場合、該方法は、エpi

トpeキメラ抗原ペプチドをコードするDNA断片を作製する段階、該DNA断片をベクターに組み込んで複製可能な発現ベクターを構築する段階、該発現ベクターを宿主細胞に導入し、ペプチドを発現する形質転換体を得る段階、さらに該形質転換体を培養し発現産物を発現させて発現したペプチドを回収する段階を含む。この製造方法も本発明の一部である。

【0042】例えば配列番号1及び2に示すアミノ酸配列を有するキメラペプチドをコードするDNA断片は実施例3に示すように作製することが可能である。さらに実施例4に示すように形質転換体を取得し、形質転換体を培養し、該ペプチドを分離、回収することが可能である。

【0043】遺伝子工学的な手法に於て発現に用いる発現ベクターとしては、実施例に示した大腸菌を宿主とし、大腸菌トリプトファンオペロンの制御下に発現させるベクター以外にも、大腸菌を宿主としては、大腸菌トリプトファンオペロン以外にもTacプロモーター、Trcプロモーター、lacプロモーター、PhoAプロモーター、λプロモーター等を利用したベクターを用いることが可能である。また大腸菌以外にも酵母を宿主とし、解糖系遺伝子、たとえばグリセロールデヒドロゲナーゼI、II、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグリセリンキナーゼ、トリオースイソメラーゼ等の酵母で慣用に用いられているプロモーターを利用した発現ベクターを用いて発現させることも可能である。さらに昆虫細胞を宿主としバキュロウイルスをベクターとした発現系、哺乳類細胞例えばCHO細胞や、COS細胞、HeLa細胞等を宿主とし、慣用的に用いられる組み込み型発現ベクターやワクチニアウイルスをベクターとした発現系、アデノウイルスや慣用的に用いられるウイルスをベクターとした発現系を利用しても発現可能である。

【0044】さらに遺伝子工学的手法を用いる場合には、キメラ抗原ペプチドを他のペプチドとの融合蛋白質として発現させることも慣用的に用いられる手段である。

【0045】上記の方法に基づくならば、グループI又はグループIIと同様に、グループIII (Okamoto et al, J. Gen. Virol. 72:2697-2704(1991))に属するHCVゲノムから、グループIIIを特異的に区別するエpitope領域を取り出してエpitopeキメラ抗原ペプチドを作製することが可能であり、これを用いることによりグループIIIに感染している患者血清のグループ判別を行なうことができる。

【0046】遺伝子工学的に発現させ回収したグループIに好適なキメラ抗原ペプチドを用いてHCV感染患者の血清中のグループI特異的な抗体を検出すると、実施例5に示すごとく、それ以前に用いていた抗原のみでは検出不可能であった患者血清のグループ判定を行なう

ことが可能となった。

【0047】したがって、本発明はさらに、エピトープキメラ抗原ペプチドと、HCVに感染したと推定される試料中のグループI又はグループII特異的な抗体との免疫学的反応を行なった後、生成する抗原-抗体複合体の濃度又は存在を測定することを含む、HCVグループ判定方法を提供する。

【0048】本発明はまた、エピトープキメラ抗原ペプチドと、HCVに感染したと推定される試料中のHCV関連抗体との免疫学的反応を行なった後、生成する抗原-抗体複合体の濃度又は存在を測定することを含む、HCV感染判定方法を提供する。

【0049】抗原-抗体複合体の濃度又は存在は、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、イムノドットプロット等々の公知の一般的方法を用いて測定することができる。上記判定の精度は、それぞれのグループ抗原に対する抗体価を測定することによりさらに向上する。また田中ら(T. Tanaka ら, Hepatology 19:1347~1353, 1994)により提唱されている判別方法を用いることもできる。

【0050】以下実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0051】

【実施例】

実施例1 コア領域ペプチドを用いたグループ判別
配列番号9及び10の配列を持つペプチドをアブライド
バイオシステム社のペプチド合成機(Model: 43

0A)を用いて合成し、逆相クロマトグラフィーにより目的のペプチドを精製した。精製したペプチドが目的の配列であることはアミノ酸シーケンサの分析により確認した。

【0052】このペプチドを2.5 µg/mlの濃度となるように8M尿素を含む0.1Mの磷酸緩衝液(pH7.5)に希釈した。希釈した抗原をマックス社のマルチモジュールプレートにウェルあたり100 µlのせ、室温に2時間静置した。抗原希釈液を除いた後、ウェルあたり100 µlのブロッキング液[0.5%カゼイン、0.15M NaCl、2.5mM EDTA、0.1M磷酸緩衝液(pH7.0)]を加え室温に2時間静置し抗原をプレートに固定した。

【0053】各ウェルに検体希釈液[0.5%カゼイン、0.5M NaCl、2.5mM EDTA、0.1M磷酸緩衝液(pH7.0)]によって11倍に希釈した非A非B型慢性肝炎患者血清100 µlを加え45分静置した。ウェルを0.1% Tween20を含むPBSで洗浄した後、100 µlのホースラディッシュパーオキシダーゼによって標識された抗ヒトIgG抗体を加え、45分静置した。ウェルを0.1% Tween20を含むPBSで洗浄した後、常法に従い、発色法により酵素活性を計測した。その結果を表2にまとめて示す。また比較のため、C14-1-2及びC14-2-2抗原を用いてグループ判別した結果と、PCR法によりグループ判別した結果を表中に示した。

【0054】

【表2】

検体 No.	PCR Group	ELISA			
		C14-1-2 (Abs)	C14-2-2 (Abs)	core	
				配列1	配列2
2	II	-0.001	>3.000 *	0.048	2.923 *
3	I	>3.000 *	0.037	2.209 *	0.035
4	I	>3.000 *	0.023	0.005	0.027
5	II	0.035	2.930 *	0.018	0.036
6	II	0.044	>3.000 *	0.253	0.250
7	I	0.727 *	-0.004	2.885 *	0.028
9	I	2.867 *	0.025	0.249	0.025
10	—	0.539 *	0.000	0.153	0.025
11	I	0.495 *	0.004	0.005	0.023
12	I	>3.000 *	0.001	2.923 *	0.026
14	I	>3.000 *	0.004	0.061	0.025
15	I	>3.000 *	0.032	0.024	0.017
16	I	0.186	0.032	2.926 *	0.027
17	II	0.010	>3.000 *	0.003	0.047
18	II	0.028	>3.000 *	0.002	0.027

〔註〕PCRのカラムにはPCR法によりグループ判別した結果を表示し、
グループIの場合はI、グループIIの場合にはIIと表中に示した。
—はPCR法により判別できなかったものを示す。一方ELISAで
くったカラムは発色法により得られたOD492での読み値を示した。
また読み値が高いものを*で表示した。

表から明らかなように、ほとんどの検体に於てはC14-1-2及びC14-2-2抗原を用いることによりグループ判別が可能であったが、検体番号16のように配列番号9のペプチドを用いることにより始めて血清学的にグループ判別が可能になるものが存在することが判明した。

【0055】実施例2 C14-1-2抗原のエピトープ解析

精製したC14-1-2ペプチドを2.5 µg/mlの濃度となるように8M尿素を含む0.1Mの磷酸緩衝液(pH7.5)に希釈した。希釈した抗原をマックス社のマルチモジュールプレートにウェルあたり200 µlのせ、室温に2時間静置した。抗原希釈液を除いた後、ウェルあたり200 µlのブロッキング液[0.5%カゼイン、0.15M NaCl、2.5mM EDTA、0.1M磷酸緩衝液(pH7.0)]を加え室温に2時間静置した。このように抗原をプレートに固定

した。検体20 µlと化学合成したペプチド(0.1 mg/ml)20 µlを等量混和し、室温1時間静置した。これに検体希釈液を200 µl加えた後にペプチドを固定したプレートに加えた。30℃1時間反応させた後、洗浄を行ない、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG(マウスモノクローナル抗体)を加え30℃1時間反応させた。洗浄した後、o-フェニレンジアミン溶液を加え、30℃1時間反応させた後1M硫酸溶液を加えることにより反応を停止させ、比色計で492nmの発色を測定した。

【0056】結果を表3に示す。表3に示した検体は全てHCVグループIに属することはtrpE・C14-1-2(特願平5-194185号)との反応性より明らかであり、グループIの配列を持つペプチドを加えることによりtrpE・C14-1-2との反応が阻害されていることが明らかである。これらの結果からC14-1-2抗原に於て患者血清中の抗体は阻害のかかったペ

プチドにエピトープが存在していることが明らかになった。
* 【0057】

* 【表3】

検 体 No.	COI ¹⁾ Imuchek -HCV	492 nmでの吸光度		
		trpE・C14-1-2	阻害を起す ペプチド	trpE・C14-2-2
CH 45	7.72<	3.000<	(1-Y)	0.168
CH 94	7.72<	3.000<	(1-Y=Z) ²⁾	0.057
LC 31	7.72<	2.300	(1-Z>B>Y) ³⁾	0.043
HCC10	7.72<	3.000<	(1-Y)	0.023
HCC25	7.72<	3.000<	(1-Z=B) ⁴⁾	0.268
LC 25	7.72<	1.750	(1-Z)	0.049
LC 92	7.72<	0.554	(1-Z)	0.004

(註) 1) COI=cut off index

2) 1-Y=Zは1-Y, 1-Zで同程度に阻害が起ることを示す。

3) 1-Z>B>Yは1-Z, 1-B, 1-Yで阻害が起り、
1-Z, 1-B, 1-Yの順にその度合いが大きいことを示す。

4) 1-Z=Bは1-Z, 1-Bにより同程度に阻害が起ることを示す。

実施例3 エピトープキメラ抗原ペプチドをコードする遺伝子の作製

【HCVグループ判定に適したエピトープキメラ抗原遺伝子の構築】

以下のDNAをDNA合成機 (ABI: Model 394A, Millipore: Model 8700) を用いて合成した。

【0058】EP1: GCGAATTCGCCTCACACCTCCCTTACATC;

EP2R: GGGTACCTACCAACGGGAGCAGCAGCTC;

CORE-F: AGGTACCCCTAAAGCTCGTCGTCCGGAAGGTCGTGCT;

CORE-R: TCCCHHHTTGAGCCCAAGCACGACCTTCCGGACG;

V4XYZ: AGACCCGGGTACCAACGGGAGCAGCAGC;

EP5: ACCCGGGAGTGTGGTCATTGTGGGTAGG; および

EP6: GAGGATCCTTATCAATCGAATCCCGGTAGAGGACTTC.

【0059】EP1とEP2R及びV4XYZはグループIのHCV cDNAからペプチドX、Y、Z領域をコードする配列を取り出すためのプライマーである。E

P5とEP6はグループIのHCV cDNAからペプチドV、Wa領域をコードする配列を取り出すためのプライマーである。

30 【0060】これらのプライマーを用いてPCR法により配列を取り出した。反応は1ngのHCV cDNA (C6-79) (本出願人らによる特願平5-193104号)、100 pmolプライマー (EP1とEP2RまたはEP1とV4XYZまたはEP5とEP6) を加え、10mM Tris-HCl (pH8.3)、2.5mM MgCl₂、0.01%ゼラチン、0.2mM dNTP、2.5U Taq DNA Polymeraseとなるよう100μlの反応液を調製し、ミネラルオイルを重層して94℃、30秒、55℃、1分、72℃、2分の条件で25サイクル反応を行なわせた。またCORE-FとCORE-Rをそれぞれ2μg加え、10mM Tris-HCl (pH8.3)、2.5mM MgCl₂、0.01%ゼラチン、0.2mM dNTP、2.5U Taq DNA Polymeraseとなるよう100μlの反応液を調製し、ミネラルオイルを重層して94℃、30秒、50℃、1分、72℃、2分の条件で15サイクル反応を行なわせた。反応液の一部をアガロース電気泳動し、EP1とEP2Rの組み合わせでは約140bpの、EP1とV4XYZの組み合わせでは約150bpの、CORE-FとCORE-Rの組

み合せでは約50bpの断片、EP5とEP6の組み合わせでは約100bpの断片を分離した。分離したDNA断片をアガロース切片からMermaid Kit (Bio101社)を用いメーカーの推奨する方法に従いTE溶液中に回収した。回収したDNA断片を25ngのpGEM-Tベクターと共に20μlの反応液[50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 10mM DTT, T4 DNAリガーゼ]中で16℃、1時間反応させた。反応液の一部を用い大腸菌XL1-Blue (Stratagen社)をHanahanの方法[DNA cloning: A practical approach (ed. D. M. Glover), vol. 1, p109-, I RC press, (1985)]に従って形質転換した。アンピシリン耐性のコロニーを選択し、形質転換体のDNAをミニプレパレーション法により調製し、制限酵素で切断することにより両断片が環状化しているプラスミドを持つ形質転換体を選択した。

【0061】EP1とEP2Rとを用いて生じた断片のクローニングされているプラスミドDNAをKpnIとEcoRIで切断し、電気泳動を行なうことにより約140bpの断片を分離し、Mermaid Kit (Bio101社)を用いメーカーの推奨する方法に従いTE溶液中に回収した。またCORE-FとCORE-Rの組み合わせで生じた断片のクローニングされているプラスミドDNAをKpnIとSmaIで切断し、電気泳動を行なうことにより約60bpの断片を分離し、Mermaid Kit (Bio101社)を用いメーカーの推奨する方法に従いTE溶液中に回収した。回収した断片とEcoRIとSmaIで切断したpT7T319U (ファルマシア社)とT4 DNAリガーゼを用いて連結反応させ、反応液の一部を用い、大腸菌SURE (Stratagen社)を形質転換した。アンピシリン耐性のコロニーを選択し、形質転換体のDNAをミニプレパレーション法により調製し、制限酵素で切断することにより両断片が結合環状化しているプラスミドを持つ形質転換体を選択した。得られたプラスミドをSmaIとBamHIで切断し、EP5とEP6で生じた断片のクローニングされているプラスミドDNAをBamHIとSmaIで切断し、電気泳動を行なうことにより100bpの断片を分離し、Mermaid Kit (Bio101社)を用い回収した断片と、T4 DNAリガーゼを用いて連結反応させた。反応液の一部を用い、大腸菌XL1-Blue (Stratagen社)を形質転換した。アンピシリン耐性のコロニーを選択し、形質転換体のDNAをミニプレパレーション法により調製し、制限酵素で切断することにより両断片が結合環状化しているプラスミドを持つ形質転換体を選択した。このようにしてGR1EPV5遺伝子断片を持つプラスミドを構築した。

【0062】構築したプラスミド1μgをEcoRI、BamH

Iで切断した(50mM Tris-HCl [pH7.5], 7mM MgCl₂, 100mM NaCl, 10 units EcoRI, 10 units BamHI/反応液量10μlで37℃1時間反応)後、この反応液をアガロース電気泳動にかけ約250bpの断片を分離した。分離した断片をMermaid Kit (Bio101社)を用い回収した。一方pTrpTrpE 1μgをEcoRI、BamHIで切断した(50mM Tris-HCl [pH7.5], 7mM MgCl₂, 100mM NaCl, 10 units EcoRI, 10 units BamHI/反応液量10μlで37℃1時間反応)後、この反応液をアガロースにかけ約3Kbpの断片を分離した。分離した断片をガラスパウダー法により回収した。回収した両断片をT4 DNAリガーゼを用いて連結反応させた。反応液の一部を用い、大腸菌XL1-Blue (Stratagen社)を形質転換した。アンピシリン耐性のコロニーを選択し、形質転換体のDNAをミニプレパレーション法により調製し、制限酵素で切断することにより両断片が結合環状化しているプラスミドを持つ形質転換体を選択した。このようにしてGR1EPV5遺伝子発現プラスミド、pTrpGR1EPV5を構築した。このプラスミドを大腸菌に移入後、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに平成6年7月7日付で寄託し、受託番号FERM P-14422を得た。

【0063】EP1とV4XYZの組み合わせで生じた断片の挿入されているプラスミドをEcoRIとSmaIで切断し生じる約150bpの断片を、電気泳動により分離し、Mermaid Kit (Bio101社)を用いメーカーの推奨する方法に従いTE溶液中に回収した。回収した断片とEcoRIとSmaIで切断したpTrpGR1EPV5とT4 DNAリガーゼを用いて連結反応させ、反応液の一部を用い、大腸菌XL1-Blue (Stratagen社)を形質転換した。その結果GR1EPV4遺伝子発現プラスミド、pTrpGR1EPV4を構築した。このプラスミドを大腸菌に移入後、同センターに平成6年7月7日付で寄託し、受託番号FERM P-14421を得た。

【0064】実施例4 エピトープキメラ抗原の発現と精製

pTrpGR1EPV4またはpTrpGR1EPV5で形質転換された大腸菌を100μg/mlアンピシリンを含むLB培地で37℃一夜培養した。これを1%濃度で100μg/mlアンピシリンを含むM9-CAに接種し37℃一夜培養した。培養終了後遠心により菌体を集め、50mlのLysis液[50mM Tris-HCl (pH8.5), 30mM NaCl, 5mM EDTA]に再懸濁し、1mlのリゾチーム液(10mg/ml Lys ozyme)を加え、37℃において1時間処理した。この懸濁液を超音波処理(150W、90秒で2回)にかけることにより細胞を破壊した。15000rpmで、4℃において30分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を50mlのNP 40を1%含むA溶液[50mM Tris-HCl (pH8.5)]に再

懸濁しホモジナイズ (1500rpm で5ストローク) した。懸濁液を15000rpmで、4℃において30分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を50mlの2M尿素を含むA溶液に再懸濁しホモジナイズ (1500rpm で5ストローク) した。懸濁液を15000rpmで、4℃において30分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を50mlの6M尿素を含むA溶液に再懸濁しホモジナイズ (1500rpm で5ストローク) した。懸濁液を15000rpmで、4℃において30分間遠心し可溶性分画を回収した。

【0065】6M尿素を含む溶液で可溶化した抗原溶液から、SセファールースHPカラム (ファルマシア社) を用いたイオン交換法とSuperdex 75 pg (ファルマシア社) を用いたゲル濾過法によりエピトープキメラ抗原ペプチドGR1EPV4 (配列番号2のアミノ酸配列を含む) 及びGR1EPV5 (配列番号1のアミノ酸配列を含む) を精製した。

【0066】実施例5 エピトープキメラ抗原ペプチドと患者血清との反応

エピトープキメラ抗原ペプチドを2.5 µg/mlの濃度となるように8M尿素を含む0.1Mの磷酸緩衝液 (pH7.5) に希

釈した。希釈した抗原をマク社のマルチモジュールプレートにウェルあたり 100 µl のせ、室温で2時間静置した。抗原希釈液を除いた後、ウェルあたり 100 µl のブロッキング液 [0.5 %カゼイン、0.15M NaCl、2.5mM EDTA、0.1M磷酸緩衝液 (pH7.0)] を加え室温で2時間静置し抗原をプレートに固定した。

【0067】各ウェルに検体希釈液 [0.5 %カゼイン、0.5M NaCl、2.5mM EDTA、0.1M磷酸緩衝液 (pH7.0)] によって11倍に希釈した非A非B型慢性肝炎患者血清 100 µl を加え45分静置した。ウェルを0.1% Tween20を含むPBS で洗浄した後、100 µl のホースラディッシュパーオキシダーゼによって標識された抗ヒトIgG 抗体を加え、45分静置した。ウェルを0.1% Tween20を含むPBS で洗浄した後、常法に従い、発色法により酵素活性を計測した。その結果を表4にまとめて示す。また比較のため、C14-1-2及びC14-2-2抗原を用いてグループ判別した結果と、PCR法によりグループ判別した結果を表中に示した。

【0068】

【表4】

番号	PCR Group	ELISA				
		C14-1-2 (Abs)	C14-1EP(Yr. 4) (Abs)	C14-1EP(Yr. 5) (Abs)	C14-2-2 (Abs)	配列1
2	II	-0.001	0.045	0.034	>3.000*	0.048
3	I	>3.000*	>3.000*	>3.000*	0.037	2.209*
4	I	>3.000*	>3.000*	>3.000*	0.023	0.005
5	II	0.035	0.094	0.056	2.930*	0.018
6	II	0.044	0.076	0.092	>3.000*	0.253
7	I	0.727*	1.432*	>3.000*	-0.004	2.885*
9	I	2.867*	2.998*	>3.000*	0.025	0.249
10	—	0.539	0.829*	1.250*	0.000	0.153
11	I	0.495	0.590	0.713*	0.004	0.005
12	I	>3.000*	>3.000*	>3.000*	0.001	2.923*
14	I	>3.000*	>3.000*	>3.000*	0.004	0.061
15	I	>3.000*	>3.000*	>3.000*	0.032	0.024
16	I	0.186	0.329	>3.000*	0.032	2.926*
17	II	0.010	0.031	0.011	>3.000*	0.003
18	II	0.028	0.356	0.450	>3.000*	0.002
22	II	1.308*	0.576*	0.402	>3.000*	0.014
25	II	>3.000*	0.952*	0.302	>3.000*	0.008

【註】PCRのカラムにはPCR法によりグループ判別した結果を表示し、
グループIの場合はI、グループIIの場合にはIIと表中に示した。—は
PCR法により判別できなかったものを示す。一方ELISAでくっ
たカラムは発色法により得られたOD492での読み値を示した。また読
み値が高いものを*で表示した。

C14-1-2と同じエピトープを持つGR1EPV4
抗原ペプチドは、ほとんどC14-1-2と同じ反応性
を示した。しかしながらグループII HCV感染患者血
清でC14-1-2に比較的強い反応を示した血清2
2、25について反応が弱くなっており、余分なエピ
トープを除くことにより判別が容易になっていることは明
らかである。

【0069】コア領域のグループ判別エピトープを含む
GR1EPV5抗原では、GR1EPV4同様血清2
2、25での判別が容易になっているのに加え、さらに
血清番号7、16において反応性が向上しており、この
抗原を用いることにより、感染しているHCVのグルー
プ判別が容易になったことは明らかである。

【0070】

【発明の効果】従来グループ判別が困難であった血清等
の検体であっても、本発明のエピトープキメラ抗原によ
ってその判別が可能となり、HCVのグルーピング判別
だけでなくHCV感染判定にも精度良く使用することが
できる。本発明に従えば、抗原抗体反応を利用した方法
に於て常に問題となる抗原抗体間の非特異反応の軽減、
抗原抗体間の特異反応の反応性向上を図ることができ、
抗原抗体反応を利用した免疫学的診断方法に適用するた
めのペプチド抗原の機能向上を達成できる。

【0071】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：321

50 配列の型：核酸

(13)

特開平 8-73497

23

24

鎖の数：二本鎖

*ハイボセティカル：YES

トポロジー：直鎖状

アンチセンス：NO

配列の種類：

*

配列

ATCGAT	ATG	AAA	GCT	ATC	TTC	GTT	CTG	AAA	GGT	TCT	CTG	GAC	CGT	GAC	48	
	Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Lys	Gly	Ser	Leu	Asp	Arg	Asp		
1				5						10						
CCA	GAA	TTC	GCC	TCA	CAC	CTC	CCT	TAC	ATC	GAA	CAG	GGA	ATG	CAG	CTT	96
	Pro	Glu	Phe	Ala	Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Gly	Met	Gln	Leu
15				20						25				30		
GCC	GAG	CAA	TTC	AAG	CAG	AAG	GCG	CTC	GGA	TTG	CTG	CAA	ACA	GCC	ACC	144
	Ala	Glu	Gln	Phe	Lys	Gln	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Gln	Thr	Ala	Thr
				35				40				45				
AAG	CAC	GCG	GAG	GCT	GCT	GCT	CCC	GTG	GTA	GGT	ACC	CCT	AAA	GCT	CGT	192
	Lys	His	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Gly	Thr	Pro	Lys	Ala	Arg
				50				55				60				
CGT	CCG	GAA	GGT	CGT	GCT	TGG	GCT	CAA	CCC	GGG	AGT	GTG	GTC	ATT	GTG	240
	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg	Ala	Trp	Ala	Gln	Pro	Gly	Ser	Val	Val	Ile	Val
				65				70				75				
GGT	AGG	ATC	ATC	TTG	TCC	GGG	AGG	CCG	GCT	GTT	ATT	CCC	GAC	AGG	GAA	288
	Gly	Arg	Ile	Ile	Leu	Ser	Gly	Arg	Pro	Ala	Val	Ile	Pro	Asp	Arg	Glu
				80				85				90				
GTC	CTC	TAC	CGG	GAG	TTC	GAT	TGATAAGGAT	CC								321
	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp									
95								100								

配列番号：2

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：279

配列の種類：

配列の型：核酸

ハイボセティカル：YES

鎖の数：二本鎖

※ アンチセンス：NO

配列

ATCGAT	ATG	AAA	GCT	ATC	TTC	GTT	CTG	AAA	GGT	TCT	CTG	GAC	CGT	GAC	48	
	Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Lys	Gly	Ser	Leu	Asp	Arg	Asp		
1				5						10						
CCA	GAA	TTC	GCC	TCA	CAC	CTC	CCT	TAC	ATC	GAA	CAG	GGA	ATG	CAG	CTT	96
	Pro	Glu	Phe	Ala	Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Gly	Met	Gln	Leu
15				20						25				30		
GCC	GAG	CAA	TTC	AAG	CAG	AAG	GCG	CTC	GGA	TTG	CTG	CAA	ACA	GCC	ACC	144
	Ala	Glu	Gln	Phe	Lys	Gln	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Gln	Thr	Ala	Thr
				35				40				45				
AAG	CAC	GCG	GAG	GCT	GCT	GCT	CCC	GTG	GTA	GGT	CGT	GGG	AGT	GTG	GTC	192
	Lys	His	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Gly	Arg	Gly	Ser	Val	Val
				50				55				60				
ATT	GTG	GGT	AGG	ATC	ATC	TTG	TCC	GGG	AGG	CCG	GCT	GTT	ATT	CCC	GAC	240
	Ile	Val	Gly	Arg	Ile	Ile	Leu	Ser	Gly	Arg	Pro	Ala	Val	Ile	Pro	Asp
				65				70				75				
AGG	GAA	GTC	CTC	TAC	CGG	GAG	TTC	GAT	TGATAAGGAT	CC						279
	Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp							
80																
								85								

配列番号：3

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：15

50 トポロジー：直鎖状

25

26

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Val Ile Pro Asp Arg Glu Ala Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu

1 5 10 15

配列番号：4

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：27

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

*

配列

Glu Cys Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala

1 5 10 15

Glu Gln Phe Lys Gln Arg Ala Leu Gly Leu Leu

20 25

配列番号：5

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：22

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列

Glu Gln Phe Lys Gln Arg Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys

1 5 10 15

Gln Ala Glu Ala Ala Ala

20

配列番号：6

★ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：16

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

★

配列

Val Val Val Thr Pro Asp Lys Glu Ile Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu

1 5 10 15

配列番号：7

☆ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：27

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

☆

配列

Glu Cys Ala Ser Lys Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Met Ala

1 5 10 15

Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu

20 25

配列番号：8

◆ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：22

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

◆

配列

Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gln Gln Ala Ser Lys

1 5 10 15

Gln Ala Gln Asp Ile Lys

20

配列番号：9

配列の種類：ペプチド

配列の長さ：20

ハイポセティカル：NO

配列の型：アミノ酸

配列

Phe Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp

1 5 10 15

Ala Gln Pro Gly

20

(15)

特開平 8-73497

27

28

配列番号: 10
配列の長さ: 20
配列の型: アミノ酸

配列の種類: ペプチド
ハイポセティカル: NO

配列

Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp
1 5 10 15
Gly Lys Pro Gly
20

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 P 21/02		C 9282-4B		
G 0 1 N 33/53		D		
33/569		L		
33/576		Z		
/(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 千葉 幸江
埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1
号 東燃株式会社総合研究所内

(72)発明者 長谷川 明
埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1
号 東燃株式会社総合研究所内